



Lishmanov, Y. B., Maslov, L. N., Krylatov, A. V., & Khaliulin, I. (2017). ИМИТАЦИЯ ФЕНОМЕНА ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ЧЕРЕЗ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КАННАБИНОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ: РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С И NO-СИНТАЗЫ. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 47(1), 25-32. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0362-2>

Peer reviewed version

Link to published version (if available):
[10.1007/s11055-016-0362-2](https://doi.org/10.1007/s11055-016-0362-2)

[Link to publication record in Explore Bristol Research](#)
PDF-document

This is the author accepted manuscript (AAM). The final published version (version of record) is available online via Springer at <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11055-016-0362-2> . Please refer to any applicable terms of use of the publisher.

University of Bristol - Explore Bristol Research

General rights

This document is made available in accordance with publisher policies. Please cite only the published version using the reference above. Full terms of use are available:
<http://www.bristol.ac.uk/red/research-policy/pure/user-guides/ebr-terms/>

ИМИТАЦИЯ ФЕНОМЕНА ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ЧЕРЕЗ
ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КАННАБИНОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ:
РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ C И NO-СИНТАЗЫ

Ю.Б. Лишманов¹, Л.Н. Маслов¹, А.В. Крылатов¹, И.Г. Халиулин²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ кардиологии», 634012
Томск, ул. Киевская 111А, Россия; ²Университет Бристоля, Бристоль, Великобритания
Email: maslov@cardio.tsu.ru

Резюме. Установлено, что стимуляция CB1-рецепторов имитирует феномен preconditionирования. Поскольку кардиопротекторный эффект каннабиноида HU-210 отмечается как в экспериментах *in vivo*, так и в опытах *in vitro*, есть основания полагать, что защитный эффект HU-210 опосредован через активацию кардиальных CB1-рецепторов. Установлено, что кардиопротекторный эффект каннабиноида HU-210 связан со стимуляцией протеинкиназы C, в то время как NO-синтаза не участвует в защитном действии стимуляции CB1-рецепторов.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, preconditionирование, каннабиноиды, протеинкиназа C, NO-синтаза

MIMICKING ISCHEMIC PRECONDITIONING PHENOMENON THROUGH THE IMPACT
ON THE CANNABINOID RECEPTORS: ROLE OF PROTEIN KINASE C AND NO-
SYNTHASE

Yu.B. Lishmanov¹, L.N. Maslov¹, A.V. Krylatov¹, I.G. Khaliulin²

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute for Cardiology», ul.
Kyevskaia 111A, 634012 Tomsk; ³University of Bristol, Bristol, UK;

It was established that CB1-receptors stimulation mimic preconditioning phenomena. Since cardioprotective effect of cannabinoid HU-210 is occurred both in the experiments *in vivo* and in the experiments *in vitro* there are reasons to believe that protective effect of HU-210 is mediated via an activation of cardiac CB1-receptors. It is established that cardioprotective effect of cannabinoid HU-210 is depend upon a stimulation of protein kinase C whereas NO-synthase are not involved in protective impact of CB1-receptor stimulation.

Key words: heart, ischemia, reperfusion, preconditioning, cannabinoids, protein kinase C, NO-synthase

Известно, что единственным эффективным методом лечения острого инфаркта миокарда является восстановление коронарной перфузии в бассейне инфаркт-связанной коро-

нарной артерии [5, 8, 10]. Без реканализации этой артерии добиться ограничения размера инфаркта миокарда невозможно. К сожалению, ишемические и реперфузионные повреждения сердца развиваются очень быстро. Так, по данным нашей лаборатории, обширный очаг некроза у крыс возникает уже после 20-минутной коронароокклюзии и 3-часовой реперфузии [9]. В данной ситуации важно выиграть время и не допустить возникновения необратимых повреждений кардиомиоцитов до момента возобновления коронарного кровотока, поэтому неоценимую помощь в борьбе с острым инфарктом миокарда могли бы оказать фармакологические и немедикаментозные воздействия, направленные на повышение толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии.

Одним из таких воздействий является открытый в 1986 г С.Е. Murry и соавт. [../../Users/maslov/sites/entrez24] феномен, названный «ишемическим прекондиционированием» (ИП, ischemic preconditioning). Суть этого феномена сводится к тому, что после 1–3 сеансов кратковременной ишемии и реперфузии миокард становится более устойчивым к действию длительной ишемии и реперфузии [24]. Кардиопротекторный эффект ИП сохраняется в эксперименте около 3 ч [7, 31]. Подобное прекондиционирование называют «ранним» или «классическим». «Золотым стандартом» прекондиционирования является уменьшение индекса «зона инфаркта/область риска» (ЗИ/ОР). Областью риска принято называть зону ишемии. К сожалению, прекондиционирование провоцирует возникновение желудочковых аритмий [22, ../../Users/maslov/sites/entrez24], поэтому в настоящее время большое внимание уделяется поиску фармакологических агентов, имитирующих феномен ИП, но не вызывающих нарушений сердечного ритма [6]. Согласно нашим предварительным данным [1], таким препаратом может быть агонист каннабиноидных (CB) рецепторов HU-210 [(6aR)-trans-3-(Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo [b,d]pyran-9-methanol]. Мы предположили, что имитация феномена ИП под влиянием HU-210 происходит за счет стимуляции CB-рецепторов и повышения активности протеинкиназы C и NO-синтазы, которые являются звеньями сигнального механизма прекондиционирования [7, 31].

Цель работы: изучить роль каннабиноидных рецепторов, протеинкиназы C и NO-синтазы в механизме HU-210-индуцированного повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

МЕТОДИКА

Эксперименты in vivo были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г, наркотизированных с помощью внутрибрюшинного введения α -хлоралозы в дозе 50 мг/кг. В ходе эксперимента осуществляли искусственную вентиляцию лёгких с

помощью модифицированного аппарата РО-6 предприятия «Красногвардеец» (Петербург, Россия). Правую сонную артерию канюлировали для измерения артериального давления (АД), которое регистрировали с помощью датчика давления SS13L «Biopac System Inc.» (Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 компании «Biopac System Inc.» (Goleta, США). Этот же аппарат использовали и для записи ЭКГ. Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании «Biopac System Inc.» (Goleta, США).

Коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч) воспроизводили, используя технику, описанную ранее J.E. Schultz и соавт. [27]. Измерение очага инфаркта осуществляли, как предложено J.E. Schultz и соавт. [27]. После каждого эксперимента производили реокклюзию левой коронарной артерии и вводили внутривенно 10% раствор красителя Patent blue violet в дозе 40 мг/кг для окрашивания области левого желудочка с нормальным кровотоком. Крыс умертвляли с помощью инъекции 15% KCl. Сердце иссекали, выделяли левый желудочек и делали шесть поперечных срезов толщиной примерно в 1 мм. Эта процедура позволяла визуализировать неишемизированную область и область риска. Зону риска отделяли от интактного миокарда. Эту зону инкубировали 15 мин с 0,1% раствором нитротетразолия синего (НТС) в 100 мМ фосфатном буфере (pH = 7,4, +37°C). Краситель НТС является индикатором жизнеспособной и нежизнеспособной ткани. Он быстро восстанавливается дегидрогеназами, которые присутствуют в живом миокарде, поэтому ткань окрашивается в серебристый цвет. Поскольку нежизнеспособный, инфарцированный миокард не содержит дегидрогеназ, ткань сохраняет бледно-розовую окраску. Зону инфаркта ЗИ и ОР оценивали гравиметрически. Затем ЗИ рассчитывали в процентах от ОР (ЗИ/ОР) и в процентах от массы левого желудочка (ЗИ/ЛЖ). ЭКГ записывали в течение 45 мин ишемии и первых 10 мин реперфузии.

В работе был использован агонист CB1- и CB2-рецепторов HU-210 [25], который вводили внутривенно в дозе 0,1 мг/кг за 15 мин до коронароокклюзии. При выборе дозы препарата мы ориентировались на наши ранее опубликованные данные [1]. Антагонист CB1-рецепторов SR141716A (N-[piperidin-1-yl]-1-[1,2-dichlorophenyl]-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamid HCl) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [13, 21]. Антагонист CB2-рецепторов SR144528 (N-(1S)-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hepta-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methyl-benzyl)-pyrazole-3-carboxamide) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [18]. Ингибитор протеинкиназы C (ПКС) хелеритрин применяли в дозе 5 мг/кг за 25 мин до корона-

роокклюзии [17]. Ингибитор NO-синтазы L-NAME (N^G -Nitro-L-Arginine methyl ester) вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [15].

Хелеритрин был плохо растворим в воде при комнатной температуре, поэтому препарат растворяли в тёплом (+55°C) физиологическом растворе, а затем охлаждали раствор до +37°C. Каннабиноид HU-210, SR141716A и SR144528 растворяли в смеси Cremaphor EL/этанол/0,9%NaCl (1:1:18) [30]. Препарат L-NAME растворяли в физиологическом растворе. Все растворы готовили непосредственно перед использованием

Эксперименты in vitro проведены на изолированных сердцах крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г, наркотизированных этиловым эфиром. После извлечения сердца из грудной клетки его быстро переносили в ванночку с охлажденным до +4°C раствором Кребса-Хензеляйта до прекращения спонтанных сокращений. Затем в восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую выполняли ретроградную перфузию сердца раствором Кребса-Хензеляйта по методу Лангендорфа. Для приготовления оксигенированного перфузионного раствора (37°C, pH 7.4), содержащего (в mM): NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20,0; глюкоза – 10,0, применяли реактивы компании «MP Biomedicals» (Ирвин, США). Раствор Кребса-Хензеляйта готовили на дистиллированной воде, которую подвергали дополнительной очистке на установке «Simplicity» компании «Millipore» (США).

Степень некротического повреждения кардиомиоцитов оценивали по уровню креатинфосфокиназы (КФК) в перфузате, оттекающем от сердца. Активность КФК определяли при помощи спектрофотометра «Smart Spec Plus» компании «Bio-Rad» (США), используя энзиматические наборы CK-NAc компании «Analiticon Biotechnologies» (Lichtenfeis, Германия). Конечный результат выражали в мкмоль НАДН/мин в пересчете на 1 г ткани миокарда. Для регистрации параметров сократимости сердца в полость левого желудочка вводили катетер с латексным баллончиком, заполненным дистиллированной водой, объем которой был достаточным для создания конечного диастолического давления на уровне 10-15 мм рт. ст. Насосную функцию сердца оценивали с помощью датчика давления SS13L компании «Biopac System Inc.» (Goleta, Калифорния, США), сопряженного с указанным баллончиком. В ходе опыта регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), давление, развиваемое левым желудочком (мм рт. ст.). Последнее вычисляли как разницу между систолическим и диастолическим давлением. В динамике эксперимента измеряли конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.).

Используемые в эксперименте препараты растворяли в диметилсульфоксиде. Исключение составлял L-NAME, его растворяли в растворе Кребса-Хензеляйта. Конечная концентрация диметилсульфоксида была равна 0,01%. В предварительных экспериментах

нами было показано, что в указанной концентрации диметилсульфоксид не влияет на ЧСС, сократимость миокарда и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии. В работе был использован агонист CB1- и CB2-рецепторов HU-210 [25]. При выборе концентраций указанного CB-агониста (0,1 мкМ/л и 1,0 мкМ/л) мы опирались на ранее опубликованные нами данные о кардиопротекторной активности HU-210 [3]. Для изучения роли CB1- и CB2-рецепторов в реализации кардиопротекторных эффектов каннабиноидов использовали селективный антагонист CB1-рецепторов SR141716 в конечной концентрации 0,1 мкМ/л [2] и селективный антагонист CB2-рецепторов SR144528 в конечной концентрации 0,1 мкМ/л [2]. Для изучения роли сигнальных систем были применены следующие фармакологические агенты: ингибитор протеинкиназы C (ПКС) хелеритрин (2 мкМ/л) [12]; ингибитор NO-синтазы L-NAME в концентрации 100 мкМ/л [11]. Схема экспериментов представлена на рис. 1. Как показано на рис. 1, перфузия сердца раствором, содержащими HU-210, продолжалась в течение 10 мин, затем следовала перфузия (10 мин) без препарата и только потом воспроизводили ишемию (45 мин) и реперфузию (30 мин). Подобный протокол эксперимента принято рассматривать, как моделирование ишемического preconditionирования [31].

Каннабиноид HU-210 был закуплен в компании «Tocris Bioscience» (Бристоль, Великобритания), cremophore EL, L-NAME, Patent blue violet, диметилсульфоксид и нитротетразолий синий были приобретены в концерне «Sigma-Aldrich» (США), хелеритрин был закуплен в компании «LC Laboratories Company» (США). Антагонисты CB-рецепторов были любезно предоставлены доктором F. Barth концерн «Sanofi-Aventis» (Франция).

Анализ данных производили с помощью программы STATISTICA 6.0. Для оценки достоверности полученных данных использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Результаты всех экспериментов представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего, n – объем анализируемой группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как показано на рис. 2, коронароокклюзия и последующая реперфузия *in vivo* вызывали формирование очага инфаркта, величина которого составила 58% от размеров зоны риска (группа контроля). Предварительное внутривенное введение HU-210 (0,1 мг/кг) обеспечивало достоверное уменьшение индекса ЗИ/ОР в 1,5 раза. Во время ишемии наблюдалось снижение систолического и среднего артериального давления (АД) на 10 мм рт. ст. У 90% крыс во время коронароокклюзии наблюдалось возникновение желудочковых аритмий (множественные желудочковые экстрасистолы, желудочковая тахикардия и

желудочковая фибрилляция). Во время реперфузии мы зарегистрировали только множественную желудочковую экстрасистолию у 7% особей (данные не представлены на рисунке). После применения HU-210 мы не зафиксировали изменений АД и частоты возникновения аритмий по сравнению с контролем (данные не представлены на рисунке).

Селективный антагонист CB1-рецепторов SR141716 полностью устранял инфаркт-лимитирующий эффект HU-210 (рис. 2), в то время как селективный антагонист CB2-рецепторов SR144528 таким действием не обладал. Сами по себе указанные антагонисты каннабиноидных рецепторов не влияли на соотношение ЗИ/ОР.

Наши дальнейшие исследования *in vivo* были направлены на изучение внутриклеточных сигнальных механизмов инфаркт-лимитирующего действия HU-210. Как показано на рис. 3, ингибитор ПКС хелеритрин устранял кардиопротекторный эффект HU-210, а введение ингибитора NO-синтазы L-NAME не отражалось на степени HU-210-индуцированного повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии. Инъекция одного хелеритрина или одного L-NAME не влияла на индекс ЗИ/ОР.

В экспериментах *in vitro* нами было установлено, что активность КФК в перфузате, оттекающем от сердца, возрастает после воздействия 45-минутной глобальной ишемии в 4,5 раза по сравнению с исходными значениями (рис. 4), что свидетельствует о некрозе кардиомиоцитов. Десятиминутная перфузия сердца раствором Кребса-Хензеляйта, содержащим HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л, способствовала снижению выброса КФК из миокарда во время реперфузии в 2 раза. Эти данные свидетельствуют об антинекротическом действии HU-210. Увеличение концентрации HU-210 до 1 мкМ/л не привело к усилению цитопротекторного эффекта использованного нами СВ-агониста (рис. 4).

В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце мы обнаружили, что ишемия-реперфузия вызывает снижение ЧСС с 202 ± 12 уд/мин до 152 ± 11 уд/мин на 5 минуте реперфузии ($p < 0,01$). Применение HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л усугубляло реперфузионную брадикардию, способствуя уменьшению ЧСС на 5 минуте реперфузии до 98 ± 11 уд/мин ($p < 0,01$ по сравнению с контролем). Увеличение концентрации HU-210 до 1 мкМ/л не приводило к усилению каннабиноид-индуцированной брадикардии.

Ишемия-реперфузия вызывала падение сократимости миокарда, о чём свидетельствовало снижение давления, развиваемого левым желудочком, с 60 ± 9 мм рт. ст. исходно до 41 ± 9 мм рт. ст. на пятой минуте реперфузии. Применение каннабиноида HU-210 не отражалось на силе сокращений левого желудочка, сниженной в условиях реперфузии.

Реперфузия (5 мин) вызывала увеличение КДД на 75 %, по сравнению с исходными значениями до ишемии ($p < 0,01$). Каннабиноид HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л не влиял на реперфузионный подъем КДД, а в концентрации 1 мкМ/л HU-210 почти полно-

стью устранял повышение КДД во время реперфузии. Разница между контролем и группой с HU-210 была достоверной ($p < 0,01$).

Каннабиноид HU-210 в концентрации 0,1 и 1,0 мкМ/л не влиял на частоту возникновения реперфузионных аритмий (данные не представлены на рисунке).

Исходя из полученных данных, в дальнейших экспериментах мы использовали HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л.

Используя антагонисты СВ-рецепторов, мы попытались выяснить рецепторную природу кардиопротекторного эффекта HU-210. Оказалось, что селективная блокада СВ1-рецепторов с помощью SR141716 полностью устраняла цитопротекторное действие HU-210 (рис. 5), в то время как антагонист СВ2-рецепторов SR144528 не влиял на защитный эффект названного каннабиноида. Применение только антагонистов никак не повлияло на реперфузионный выброс КФК из миокарда.

Внесение в перфузионный раствор перед моделированием ишемии ингибитора ПКС хелеритрина полностью устраняло кардиопротекторный эффект HU-210 (рис. 6). Добавление в перфузионный раствор ингибитора NO-синтазы L-NAME не устраняло HU-210-индуцированное повышение толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии (рис. 6). Применение одного L-NAME или одного хелеритрина не влияло на уровень КФК в перфузате, оттекающем от сердца.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших экспериментов *in vivo* убедительно свидетельствуют о том, что инфаркт-лимитирующее действие HU-210 опосредовано через активацию СВ1-рецепторов, так как селективный антагонист последних SR141716 полностью устранял указанный эффект. Есть основания утверждать, что эндогенные каннабиноиды у неадаптированных животных не участвуют в регуляции толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии, поскольку сами по себе антагонисты СВ-рецепторов не влияли на соотношение ЗИ/ОР. Ключевую роль в механизме кардиопротекторного влияния HU-210 играет протеинкиназа С. Аргументом в пользу такого умозаключения можно считать исчезновение инфаркт-лимитирующего эффекта HU-210 после применения ингибитора ПКС хелеритрина. Этот факт согласуется с общепринятой точкой зрения о том, что ПКС играет важную роль в механизмах ишемического preconditionирования, а кардиопротекторный эффект веществ, имитирующих этот феномен, также связан с активацией протеинкиназы С [6, 7, 31]. В недавно опубликованной обзорной статье мы подробно изложили сведения о том, что помимо «классического» ИП существует и отсроченное preconditionирование [4]. Суть этого феномена сводится к тому, что через 24 ч после последнего кратковремен-

ного сеанса коронароокклюзии наблюдается повторное повышение толерантности сердца к ишемии и реперфузии [4]. Ключевую роль в реализации отсроченного ИП играет NO-синтаза [4], поскольку ингибиторы NO-синтазы полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект отсроченного preconditionирования. Однако в механизмах кардиопротекторного эффекта раннего ИП этот фермент не участвует [23]. Результаты экспериментов *in vivo*, полученные в настоящем исследовании, позволяют нам утверждать, что инфаркт-лимитирующий эффект HU-210 не зависит от активации NO-синтазы. Этот факт говорит о том, что использование названного каннабиноида позволяет имитировать феномен классического preconditionирования.

В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце нами было установлено, что кардиопротекторный эффект HU-210 является следствием активации кардиальных CB1-рецепторов, поскольку этот эффект не проявлялся на фоне их селективной блокады. Вместе с тем, приведенные выше результаты настоящего исследования показывают, что эндогенные каннабиноиды не принимают участия в регуляции устойчивости изолированного сердца к патогенному действию ишемии-реперфузии у неадаптированных особей.

Как и в случае экспериментов *in vivo*, ингибирование ПКС хелеритрином устраняло HU-210-индуцированное повышение толерантности изолированного сердца к действию ишемии-реперфузии. Ингибитор же NO-синтазы L-NAME не влиял на кардиопротекторный эффект HU-210. Исходя из этого, можно утверждать, что NO-синтаза, в отличие от ПКС, не участвует в реализации кардиопротекторного эффекта HU-210.

Результаты наших экспериментов согласуются с данными других исследователей, обнаруживших аналогичный кардиопротекторный эффект у агонистов каннабиноидных рецепторов [14, 20, 28, 29]. Спорным остаётся вопрос о рецепторной природе такого эффекта каннабиноидов. Одни исследователи полагают, что кардиопротекторный эффект агонистов CB-рецепторов связан с активацией анандамидового рецептора [29], который не относится к CB1- и CB2-рецепторам. Другие считают, что инфаркт-лимитирующее действие каннабиноидов связано с активацией CB2-рецепторов [14, 28]. Третьи утверждают [20], что добиться повышения толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии можно за счёт стимуляции как CB1-рецепторов, так и CB2-рецепторов. На основании полученных данных мы полагаем, что в регуляции устойчивости сердца к ишемии-реперфузии принимают участие только CB1-рецепторы. Причина противоречий в оценке рецепторной природы кардиопротекторного действия каннабиноидов остаётся неясной. Вполне возможно, что она кроется в использовании авторами разных агонистов CB-рецепторов.

При анализе публикаций, посвященных внутриклеточному сигналингу кардиопротекторного действия каннабиноидов, нам встретилась только одна статья, авторы которой

обнаружили, что кардиопротекторный эффект каннабиноида пальмитоилэтаноламида связан с активацией ПКС [19]. Этот факт согласуется с результатами наших исследований. Вместе с тем, следует отметить, что пальмитоилэтаноламид является агонистом каннабиноидного GPR55-рецептора и CB2-рецептора и не взаимодействует с CB1-рецепторами [16, 26]. Следовательно, есть веские основания полагать, что протекторный эффект пальмитоилэтаноламида связан с активацией GPR55- или CB2-рецепторов, а кардиопротекторное действие HU-210 является результатом оккупации CB1-рецепторов. Ключевую роль в механизме реализации инфаркт-лимитирующего действия обоих каннабиноидов, скорее всего, играет ПКС.

В 2007 г канадские физиологи [20] опубликовали результаты своих экспериментов на изолированном перфузируемом сердце крысы. Они воспроизводили 90-минутную ишемию низкого протока (low-flow ischemia), снижая коронарный проток до 0,6 мл/мин, после чего следовала 30-минутная реперфузия. Фармакологические агенты добавляли в перфузат за 5 мин до ишемии, перфузия с препаратами продолжалась на протяжении всего периода ишемии и заканчивалась в момент начала реперфузии, то есть общая продолжительность воздействия фармакологических агентов составляла 95 мин [20]. По их данным, размер соотношения ЗИ/ОР уменьшал селективный агонист CB1-рецепторов ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) и селективный агонист CB2-рецепторов JWH015 (2-methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone) [19, 20]. Инфаркт-лимитирующий эффект ACEA не проявлялся в условиях блокады NO-синтазы с помощью L-NAME, а кардиопротекторный эффект JWH015 в этих условиях сохранялся [20]. На первый взгляд, эти данные противоречат результатам наших исследований, которые говорят о том, что NO-синтаза не принимает участия в инфаркт-лимитирующем действии HU-210. Однако следует обратить внимание на то, что продолжительность воздействия HU-210 в наших исследованиях составляла 10 мин, а длительность перфузии сердца раствором, содержащим каннабиноидов, в опытах наших канадских коллег составляла 95 мин. Можно предположить, что каннабиноид-индуцированная активация NO-синтазы в кардиомиоцитах наблюдается только при длительной стимуляции CB1-рецепторов.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что стимуляция CB1-рецепторов представляет собой вариант фармакологической имитации феномена preconditionирования. Поскольку кардиопротекторный эффект каннабиноида HU-210 отмечается как в экспериментах *in vivo*, так и в опытах *in vitro*, есть основания полагать, что защитный эффект HU-210 опосредован через активацию кардиальных CB1-рецепторов. Полученные данные позволяют утверждать, что кардиопротекторный эффект

каннабиноида HU-210 связан со стимуляцией протеинкиназы C, в то время как NO-синтаза не участвует в защитном действии стимуляции CB1-рецепторов.

Статья подготовлена при поддержке Российского научного фонда грант 14-15-00008.

Авторы благодарят доктора F. Barth (Sanofi-Aventis, Франция) за предоставленные антагонисты каннабиноидных рецепторов.

Л.Н. Маслов

А.В. Крылатов

Ю.Б. Лишманов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Крылатов А.В., Бернацкая Н.А., Маслов Л.Н., Пертви Р.Дж., Мехоулам Р., Стефано Дж.Б., Шараевский М.А., Сальников О.М. Повышение устойчивости сердца к аритмогенным воздействиям и уменьшение зоны ишемического некроза миокарда при активации каннабиноидных рецепторов. Росс. физиол. жур. 88 (5) : 560–567. 2002.

[2] Крылатов А.В., Маслов Л.Н., Ласукова О.В., Пертви Р.Дж. Антагонисты каннабиноидных рецепторов SR141716 и SR144528 проявляют свойства парциальных агонистов в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы. Бюлл. exper. биол. и мед. 139 (5) : 512–516. 2005.

[3] Ласукова О.В., Маслов Л.Н., Ермаков С.Ю., Крауфорд Д., Барт Ф., Крылатов А.В., Хануш Л.О. Роль каннабиноидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии. Известия РАН. Серия биол. 35 (4) : 471–478. 2008.

[4] Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Криг Т., Халиулин И.Г. Проблема конечного эффектора позднего ишемического preconditionирования сердца. Росс. Физиол. жур. 96 (4) : 337-352. 2010.

[5] Марков В.А., Рябов В.В., Максимов И.В., Вышков Е.В., Демьянов С.В., Сыркина А.Г., Белокопытова Н.В., Шурупов В.С., Оюнаров Э.О., Максимов А.И., Васильев А.Г. Вчера, сегодня, завтра в диагностики и лечении острого инфаркта миокарда. Сиб. мед. жур. (Томск). 26 (2), Вып. 1: 8–14. 2011.

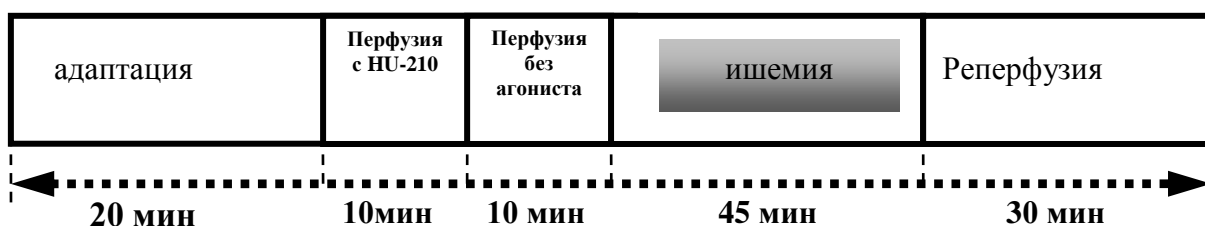
[6] Маслов Л.Н. Новые подходы к профилактике и терапии ишемических и реперфузионных повреждений сердца при остром инфаркте миокарда. Сиб. мед. жур. (Томск). 25 (2) Вып. 1: 17–24. 2010.

- [7] *Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В.* Адаптация миокарда к ишемии. Первая фаза ишемического preconditionирования. Успехи физиол. наук. 37 (3): 25–41. 2006.
- [8] *Рябов В.В., Оюнаров Э.О., Марков В.А.* Лечение острого инфаркта миокарда, осложненного рецидивирующей ишемией миокарда: сравнение эффективности двух стратегий – инвазивной и консервативной в сочетании с наружной контрпульсацией. Сиб. мед. жур. (Томск). 26 (2), Вып. 1: 42–47. 2011.
- [9] *Цибульников С.Ю.* Исследование рецепторной природы опиоидного компонента кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии. Патогенез № 3: 69. 2011.
- [10] *Чазов Е.И.* Как уменьшить смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Тер. архив. 80 (8) : 11–16. 2008.
- [11] *Andelova E., Bartekova M., Pancza D.* The role of NO in ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. Gen. Physiol. Biophys. 24 (4) : 411–426. 2005.
- [12] *Bugge E., Ytrehus K.* Ischaemic preconditioning is protein kinase C dependent but not through stimulation of alpha adrenergic or adenosine receptors in the isolated rat heart. Cardiovasc. Res. 29 (3) : 401–406. 1995.
- [13] *Compton D.R., Aceto M.D., Lowe J., Martin B.R.* In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 277 (2) : 586–594. 1996.
- [14] *Di Filippo C., Rossi F., Rossi S., D'Amico M.* Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. J. Leukoc. Biol. 75 (3) : 453–459. 2004.
- [15] *Ebrahim Z., Yellon D.M., Baxter G.F.* Bradykinin elicits "second window" myocardial protection in rat heart through an NO-dependent mechanism. Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol. 281 (3) : H1458–H1464. 2001.
- [16] *Facci L., Dal Toso R., Romanello S., Buriani A., Skaper S.D., Leon A.* Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with different sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (8) : 33763–380. 1995.
- [17] *Fryer R.M., Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J.* Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts Am. J. Physiol. 276 (4 Pt 2) : H1229–H1235. 1999.

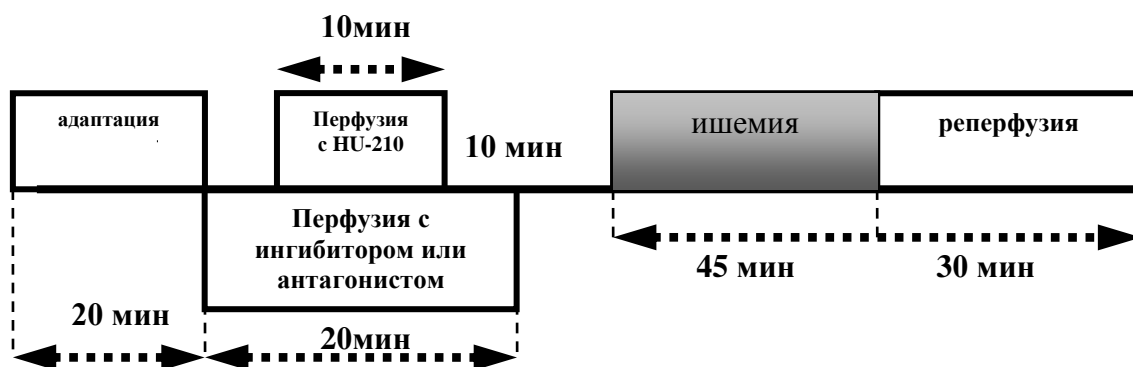
- [18] Hanus L., Breuer A., Tchilibon S., Shiloah S., Goldenberg D., Horowitz M., Pertwee R.G., Ross R.A., Mechoulam R., Fride E. HU-308: a specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (25) : 14228–14233. 1999.
- [19] Lepicier P., Bouchard J.F., Lagneux C., Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* 139 (4) : 805–815. 2003.
- [20] Lepicier P., Lagneux C., Sirois M.G., Lamontagne D. Endothelial CB1-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Sci.* 81 (17-18) : 1373–1380. 2007.
- [21] Lichtman A.H., Wiley J.L., LaVecchia K.L., Nevaser S.T., Arthur D.B., Wilson D.M., Martin B.R. Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 357 (2-3) : 139–148. 1998.
- [22] Lu H.R., Yang P., Remeysen P., Saels A., Dai D.Z., De Clerck F. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats: a role of Na⁺ and Ca²⁺ influx. *Eur. J. Pharmacol.* 365 (2-3) : 233–239. 1999.
- [23] Marina Prendes M.G., González M., Savino E.A., Varela A. Role of endogenous nitric oxide in classic preconditioning in rat hearts. *Regul. Pept.* 139 (1-3) : 141–145. 2007.
- [24] Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74 (5) : 1124–1136. 1986.
- [25] Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6 (8) : 635–664. 1999.
- [26] Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152 (7) : 1092–1101. 2007.
- [27] Schultz J.E., Yao Z., Cavero I., Gross G.J. Glibenclamide induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am. J. Physiol.* 272 (6 Pt 2) : H2607–H2615. 1997.
- [28] Shmest Y.A., Goncharov I., Eichler M., Shneyvays V., Isaac A., Vogel Z., Shainberg A. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol. Cell. Biochem.* 283 (1-2) : 75–83. 2006.
- [29] Underdown N.J., Hiley C.R., Ford W.R. Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischaemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 146 (6) : 809–816. 2005.
- [30] Welch S.P. Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimone, but not N,N-Diallyl-Tyrosine-Aib-Phenylalanine-Leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265 (2) : 633–640. 1993.
- [31] Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology



(а)



(б)



(в)

Рис. 1. Схема экспериментов, проводимых на изолированном сердце; а - контроль; б, в – опыт.

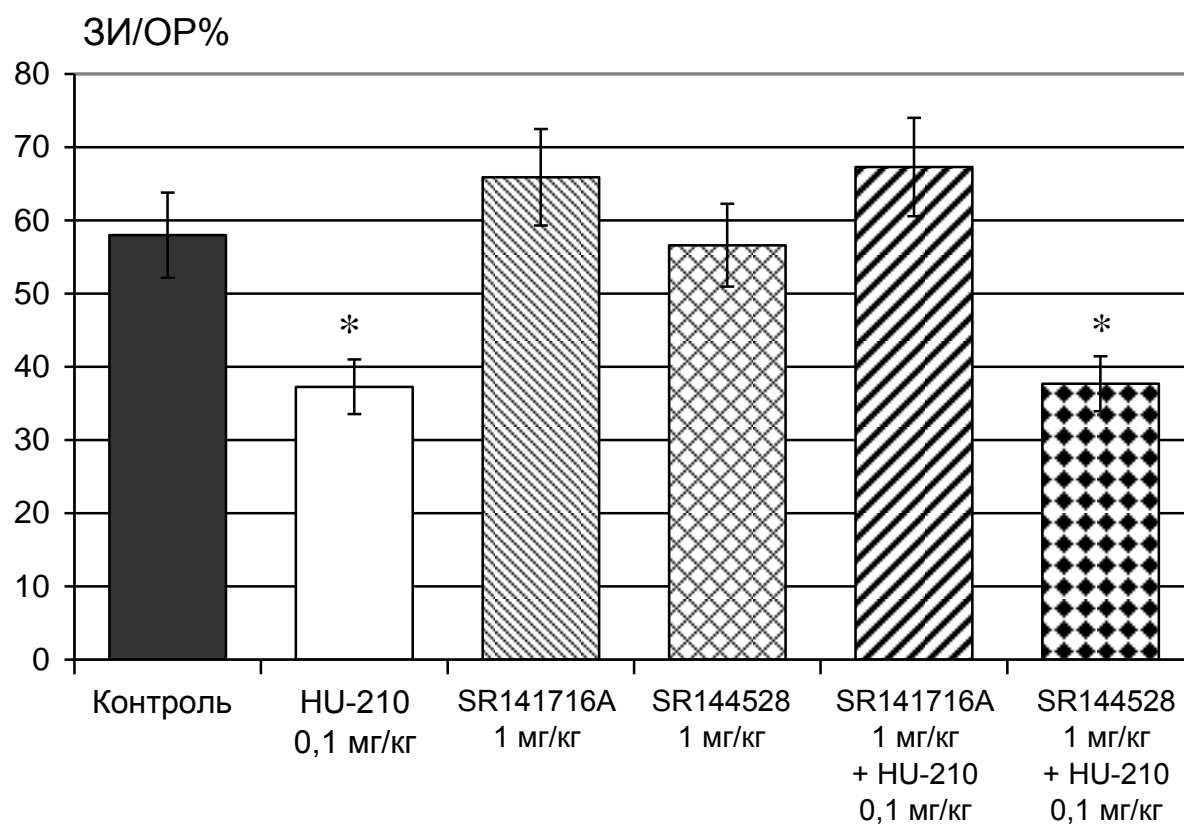


Рис. 2. Влияние агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (0,1 мг/кг) и антагонистов: CB1 рецепторов- SR141716A (1,0 мг/кг) и CB2 - SR144528 (1,0 мг/кг) на процентное отношение зоны некроза к зоне риска при экспериментальной модели инфаркта миокарда (45 минут ишемия с последующей 120 минутной реперфузией).

Примечание: * - достоверность относительно контрольной группы $p < 0,01$

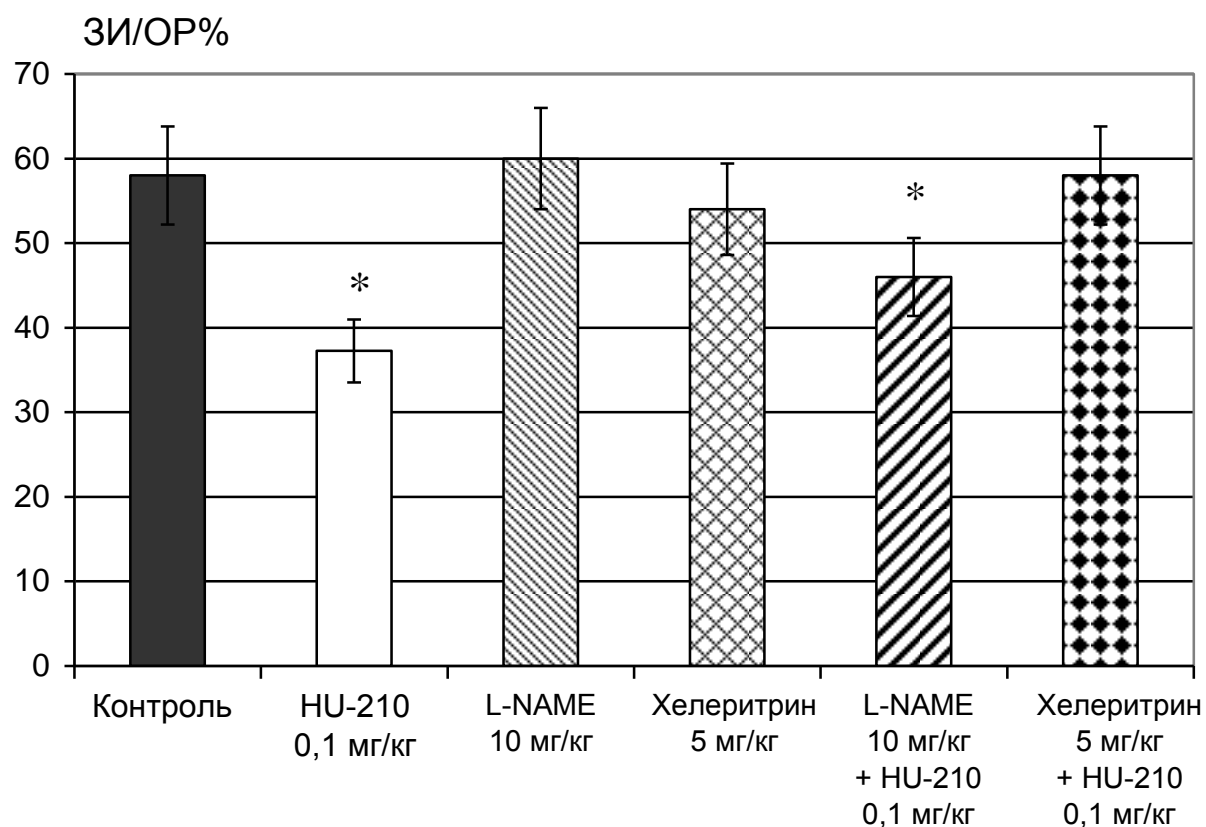


Рис. 3. Влияние агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (0,1 мг/кг) ингибиторов NO-синтазы L-NAME и протеинкиназы С хелеритрина на процентное отношение зоны некроза к зоне риска при экспериментальной модели инфаркта миокарда (45 минут ишемия с последующей 120 минутной реперфузией).

Примечание: * - достоверность относительно контрольной группы $p < 0,01$

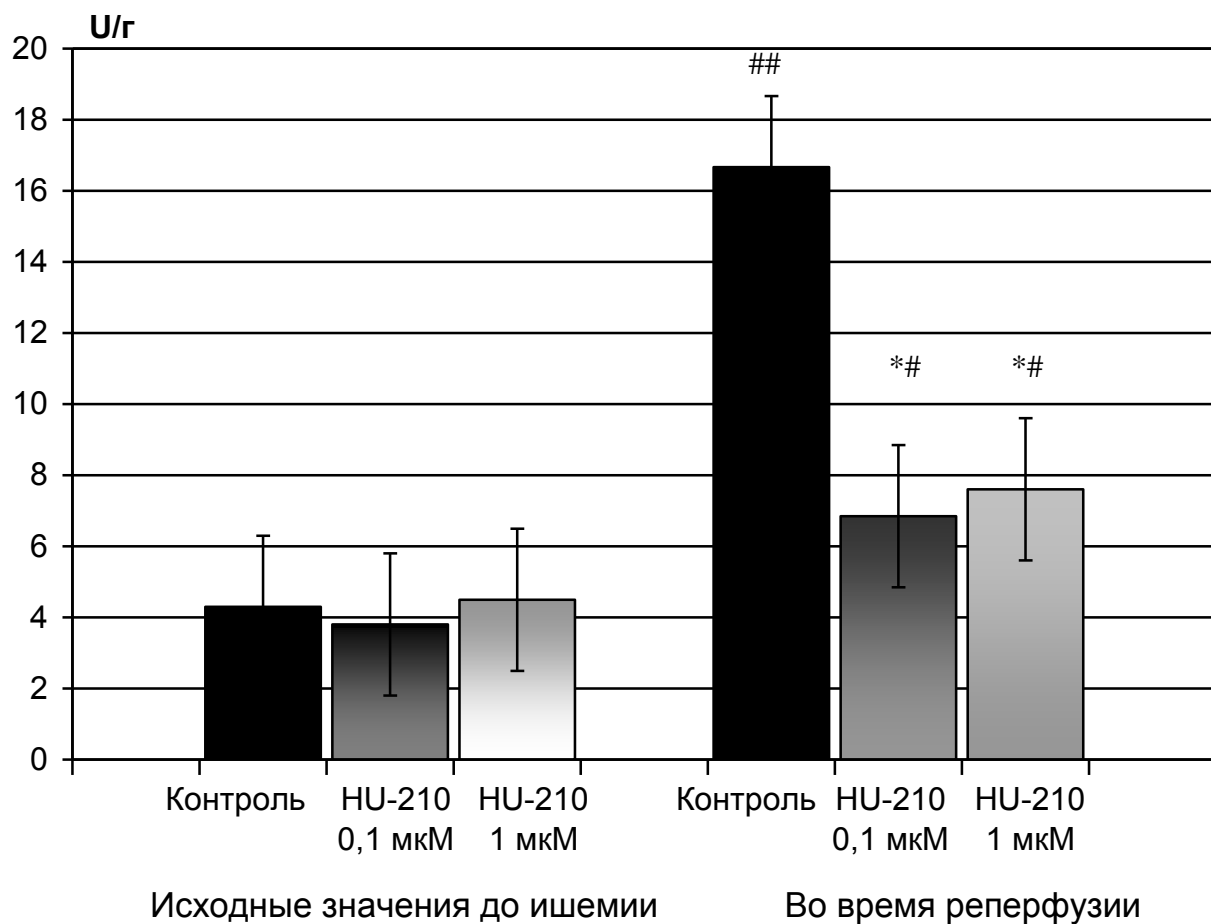


Рис. 4. Влияние HU-210 в концентрациях 0,1 мкМ и 1 мкМ на активность креатин-фосфокиназы в перфузионном растворе до ишемии и во время реперфузии.

Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $P < 0,05$; ## – $P < 0,01$ по сравнению с исходными значениями.

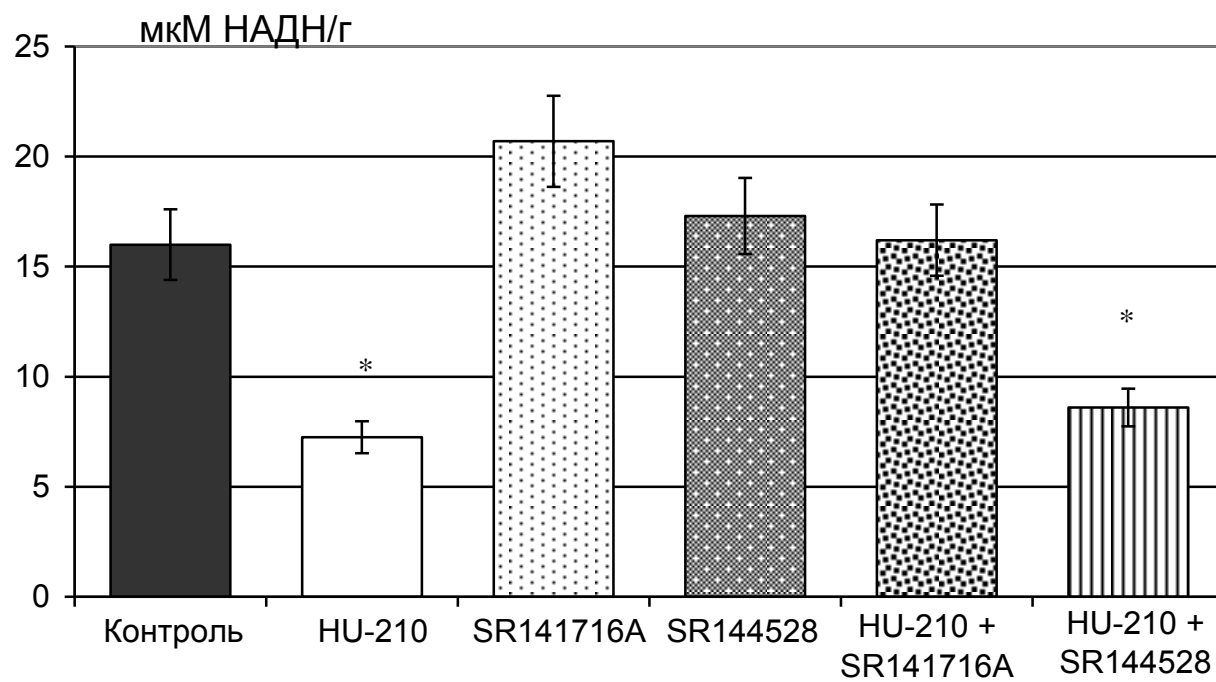


Рис. 5. Уровень КФК в перфузате во время реперфузии в сериях с применением агониста CB1- и CB2-рецепторов HU-210 (0,1 мкМ), антагониста CB1-рецепторов SR141716 (0,1 мкМ) и антагониста CB2-рецепторов SR144528 (0,1 мкМ). Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

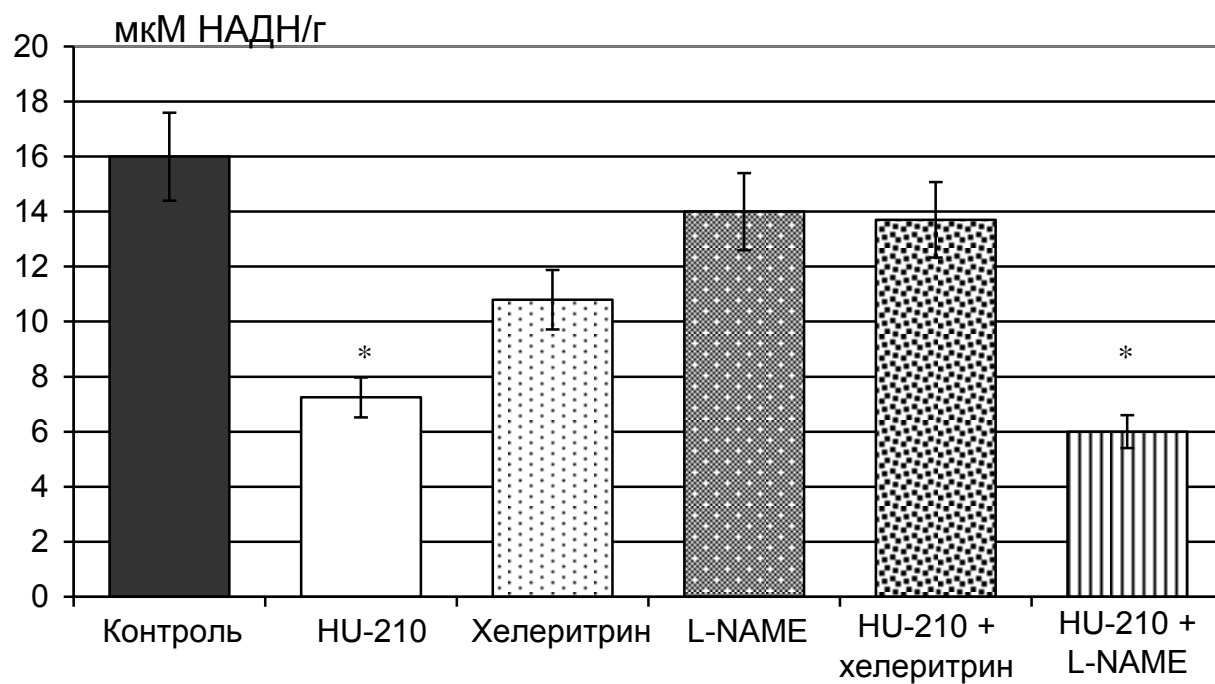


Рис. 6. Уровень КФК в перфузате во время реперфузии в сериях с применением агониста CB1- и CB2-рецепторов HU-210 (0,1 мкМ), антагониста CB1-рецепторов SR141716 (0,1 мкМ) и антагониста CB2-рецепторов SR144528 (0,1 мкМ). Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем.